

OSTEOPROTEGERIN

ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF OSTEOPROTEGERIN IN
EDTA PLASMA, HEPARIN PLASMA, SERUM OR CELL CULTURE SUPERNATANTS
CAT. NO. BI-20402 . 12 X 8 TESTS

ENZYM IMMUNOASSAY ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON OSTEOPROTEGERIN IN EDTA
PLASMA, HEPARIN PLASMA, SERUM ODER ZELLKULTUR
KAT. NR. BI-20402 . 12 X 8 TESTS

ESSAI IMMUNOENZYMATIQUE POUR LA DETERMINATION QUANTITATIVE DE
L'OSTEOPROTEGERIN DANS LE PLASMA EDTA, LE PLASMA HEPARIN, LE SERUM OU LES
SURNAGEANTS DE CULTURE CELLULAIRE
CAT. NO. BI-20402 . 12 X 8 TESTS

ENZYME IMMUNOASSAY PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DEL OSTEOPROTEGERIN NEL
PLASMA EDTA O NEL PLASMA EPARINA, NEL SIERO O NEL SURNATANTE DE COLTURA
CELLULARE.
CODICE: BI-20402 . 12 X 8 DETERMINAZIONI

ENZIMOINMUNOENSAYO PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA DE OSTEOPROTEGERINA EN
PLASMA EDTA, PLASMA HEPARINIZADO, SUERO O SOBRENADANTE DE CUTIVOS CELULARES
CAT. NO. BI-20402 . 12 X 8 TESTS

rev.no. 010805 (replacing 301004)



Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, A-1210 Wien, Divischgasse 4
Tel. +43/1/291 07 59, Fax +43/1/291 07 85, E-mail export@bmgrp.at

BIOMEDICA

BIOMEDICA
GRUPPE 
www.bmgrp.com

CONTENT / INHALT / SOMMAIRE / CONTENUTO / CONTENIDO

- 1) ENGLISH3**
- 2) GERMAN7**
- 3) FRENCH11**
- 4) ITALIANO15**
- 5) ESPANIOL19**

*Additional Information about our products is available on our homepage
Zusätzliche Information zu unseren Produkten ist auf unserer Homepage erhältlich
Pour toute information complémentaire sur nos produits, visiter notre site Internet
Ulteriori informazioni sui nostri prodotti sono disponibili sulla nostra home page
Encontrará información adicional sobre nuestros productos en nuestra página web*

www.bmgrp.com

1) INTRODUCTION

Osteoprotegerin (OPG) or Osteoclast inhibitory factor (OCIF) is a dimeric glycoprotein of the TNF receptor family with a molecular weight of 60 kD and 120 kD respectively. OPG acts as a soluble secreted receptor for RANKL that prevents it from binding to and activating RANK (osteoclast differentiation and activation receptor, ODAR) on the osteoclast surface, thus inhibiting the osteoclast development.

POSSIBLE INDICATIONS

- Postmenopausal and senile Osteoporosis
- Glucocorticoid-induced Osteoporosis
- Diseases with locally increased resorption activity
- Therapy monitoring after treatment with OPG
- Arthritis
- Oncology

2.) CONTENT OF THE KIT

CONT	KIT COMPONENTS	QUANTITY
PLATE	Monoclonal Anti-OPG Antibody, pre-coated microtiter strips in a strip holder	12 x 8 tests
WASHBUF	Wash buffer, 20x concentrated	1 x 50 ml
AB	Polyclonal biotinylated anti OPG antibody (yellow cap), ready to use	1 x 7 ml
STD	Standards, (0; 0.37; 1.1; 3.3; 10; 30 pmol/l), ready to use	6 x 500 µl
CTRL	Control (yellow cap), ready to use	1 x 500 µl
ASYBUF	Assay Buffer, ready to use	1 x 25 ml
CONJ	Conjugate, (streptavidin- HRPO), ready to use	1 x 22 ml
SUB	Substrate (TMB solution), ready to use	1 x 22 ml
STOP	Stop solution, ready to use	1 x 7 ml
OPG-STOCK	Osteoprotegerin stock solution, red cap, (500 pmol/l)	1 x 500 µl

3) ADDITIONAL MATERIAL ADDED TO THE KIT

- 2 self-adhesive plastic films
- QC protocol
- Protocol sheet
- Instruction manual for use

4) MATERIAL AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- 1,5 ml reaction vials
- Precision pipettes calibrated to deliver 10-1000 µl and disposable tips
- Elisa reader for absorbance at 450 nm (or from 450 nm to 620 nm)
- Plate washer is recommended for washing
- Distilled or deionised water

5) REAGENTS AND SAMPLE PREPARATION

Samples should be stored at -20°C, for long-term storage store at -70°C. All samples should undergo only 4 freeze-thaw cycles. Lipemic or haemolysed samples may give erroneous results. Samples should be mixed well before assaying.

Reconstitute as follows:

WASHBUF (Wash buffer): Dilute the concentrate 1:20: e.g. 50 ml WASHBUF + 950 ml distilled water. Crystals in the buffer concentrate will dissolve at room temperature. Buffer is stable at 2-8°C until expiry date stated on label.

Use only diluted WASHBUF (Wash buffer) for optimum assay performance:

Cell Culture:

Dilute the OPG-STOCK (Osteoprotegerin stock solution) with Cell Culture Medium 1:20 (1+19) for STD1 (50 µl OPG-STOCK + 950 µl Medium).

Dilute the Standard for the Standard curve 1:2 (1+1) as it is shown in the scheme:

STD1 (25 pmol/l)

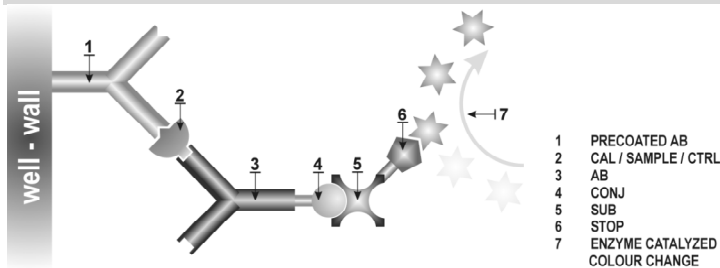
250 µl STD1 + 250 µl dilution medium = STD2 (12.5 pmol/l)

250 µl STD2 + 250 µl dilution medium = STD3 (6.25 pmol/l)

250 µl STD3 + 250 µl dilution medium = STD4 (3.13 pmol/l)

Use Cell Culture Medium as STD0 (Standard 0)

6) PRINCIPLE OF THE ASSAY



7) ASSAY PROTOCOL

All reagents and samples must be at room temperature (18-26°C) before use in the assay
Mark position for BLANK/STD/SAMPLE/CTRL (Blank/Standard/Sample/Control) on the protocol sheet
Take microtiter strips out of the alu bag, take a minimum of one well as Blank. Store unused strips with desiccant at 2-8° C in the alu bag. Strips are stable until expiry date stated on the label.
Add 100 µl ASYBUF (Assay Buffer) into each well. Pipette additional 100 µl into well marked as blank.
Add 50 µl STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) in duplicate into respective well, except blank
Add 50 µl AB (biotinylated anti OPG antibody) into each well, except blank, swirl gently
Cover tightly and incubate over night (18-24h) at 4°C
Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer), remove remaining WASHBUF by hitting plate against paper towel after the latest wash
Add 200 µl CONJ (Conjugate) into each well
Cover tightly and incubate at room temperature (18-26°C) for 1 hour
Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer), remove remaining WASHBUF by hitting plate against paper towel after the latest wash
Add 200 µl SUB (Substrate) into each well
Incubate for 20 min at room temperature (18-26°C) in the dark
Add 50 µl STOP (Stop solution) into each well
Measure absorbance immediately at 450 nm with reference 620 nm, if available

8) CALCULATION OF RESULTS

Subtract the blank extinction from all other values. Construct the standard curve from the standard values. Use commercially available software or graph paper. Obtain sample concentration from this standard curve. The assay was evaluated with 4PL algorithm. Different curve fitting methods need to be evaluated by the user. Respective dilution factors have to be considered.

9) ASSAY CHARACTERISTICS

Normal range:	Median = 1.8 pmol/l (n = 1134; age 19-96) It is recommended to establish the normal range for each laboratory.
Standard range:	0 to 30 pmol/l
Conversion factor pg/ml to pmol/l:	1 pg/ml = 0.05 pmol/l (MW: 19.9 kD)
Sample volume:	50 µl human EDTA plasma, Heparin plasma, serum, cell culture supernatant
Detection Limit:	(0 pmol/l + 3 SD): 0.14 pmol/l
Incubation time:	18 – 24 h / 1h / 20 min

10) PRECISION

Intra-Assay: 2 samples of known concentrations were tested 16 times to assess intra-assay precision

Inter-Assay: 2 samples of known concentrations were tested in 10 Assays to assess inter-assay precision

Intra-Assay (n=16)		
Mean (pmol/l)	4.59	10.76
SD	0.46	0.41
CV%	10%	4%

Inter-Assay (n=10)		
Mean (pmol/l)	5.53	10.1
SD	0.38	0.76
CV%	7%	8%

11) TECHNICAL HINTS

- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
- Do not mix stoppers and caps from different reagents or use reagents between lots.
- Do not use reagents beyond expiration date. Protect reagents from direct sunlight.
- Substrate solution should remain colourless until added to the plate.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.

12) PRECAUTIONS

All test components of human source were tested with 3rd generation tests against HIV-Ab and HBsAG; and were found negative. Nevertheless, they should be handled and disposed as if they were infectious.

All liquid reagents contain 0.01% Thimerosal or 0.01%Proclin 300 as preservative.

Thimerosal is toxic! Avoid contact with skin and mucous membrane. Proclin 300 is not toxic in concentrations used in this kit. It may cause allergic skin reactions-avoid contact with skin or eyes.

- Do not pipette by mouth.
- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics where reagents are used.
- Avoid all contact with the reagents by using gloves.
- Sulfuric acid is irritating to eyes and skin. Flush with water if contact occurs. Avoid contact with skin and mucous. Irritations are possible - Flush with water after contact!!

13) LITERATURE

- "Clinical Implications of the Osteoprotegerin/RANKL/RANK System for Bone and Vascular Diseases"
Lorenz C. Hofbauer, MD; Michael Schoppet, MD; JAMA, July 28, 2004—Vol 292, No. 4
- "Comparison of 10 serum bone turnover markers in prostate carcinoma patients with bone metastatic spread: diagnostic and prognostic implications".
Jung K; Lein M; Stephan C; Von Hosslin K; Semjonow A; Sinha P; Loening SA; Schnorr D Department of Urology, University Hospital Charite, Humboldt University of Berlin, Berlin, Germany. Int J Cancer 2004 Sep 20;111(5):783-91
- "Osteoprotegerin is a Risk Factor for Progressive Atherosclerosis and Cardiovascular Disease"
Stefan Kiechl, MD; Georg Schett, MD; Gregor Wenning, MD; Kurt Redlich, MD; Martin Oberhollenzer, MD; Agnes Mayr, MD; Peter Santer, MD; Josef Smolen, MD; Werner Poewe, MD; Johann Willeit, MD
Circulation. 2004;109:2175-2180.
- "Endurance running acutely raises plasma osteoprotegerin and lowers plasma receptor activator of nuclear factor kappa B ligand" [In Process Citation];
Ziegler S; Niessner A; Richter B; Wirth S; Billensteiner E; Woloszczuk W; Slany J; Geyer G
Metabolism 2005 Jul;54(7):935-8

1) EINLEITUNG

Osteoprotegerin (OPG) oder Osteoclast inhibitory factor (OCIF) ist ein dimeres Glycoprotein der TNF Rezeptor Familie, mit einem Molekulargewicht von 60kD respektive 120 kD. OPG verhindert die Bindung von RANK und RANKL und hemmt dadurch die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten und somit den osteolytischen Prozess.

MÖGLICHE INDIKATIONEN

- Postmenopausale und Senile Osteoporose
- Glucocorticoid induzierte Osteoporose
- Arthritis
- Krankheiten mit lokal induzierter Knochenresorptionsaktivität
- Onkologie

2) INHALT DES KITS

CONT	KIT KOMPONENTEN	MENGE
PLATE	Monoklonaler anti OPG Antikörper, beschichtet auf Mikrotiterplattenstreifen im Streifenhalter. Verpackt im Alu Säckchen mit Trockenmittel	12 x 8 Tests
WASHBUF	Wasch Puffer, 20fach Konzentrat	1 x 50 ml
AB	Polyklonaler Biotinylierter anti OPG Antikörper (gelbe Kappe), gebrauchsfertig	1 x 7 ml
STD	Standards, (0; 0,37; 1,1; 3,3; 10; 30 pmol/l), gebrauchsfertig	6 x 500 µl
CTRL	Kontrolle (gelbe Kappe), gebrauchsfertig	1 x 500 µl
ASYBUF	Verdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 25 ml
CONJ	Konjugat, (Streptavidin- HRPO), gebrauchsfertig	1 x 22 ml
SUB	Substrat (TMB Lösung), gebrauchsfertig	1 x 22 ml
STOP	Stopp Lösung H2SO4, gebrauchsfertig	1 x 7 ml
OPG-STOCK	Osteoprotegerin Konzentrat, rote Kappe, (500 pmol/l),	1 x 500 µl

3) ZUSÄTZLICHES MATERIAL IM KIT

- 2 selbstklebende Abdeckfolien
- QC Protocoll
- Protokoll Blatt
- Arbeitsanleitung (Beipacktext)

4) ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL UND GERÄTE

- Reaktionsgefäß 1,5 ml
- Kalibrierte Präzisionspipetten für 10-1000 µl, inkl. Pipettenspitzen
- Mikrotiterplattenphotometer mit 450 nm Filter (620 nm Referenz)
- Halblogarithmisches Millimeterpapier oder Software
- Mikrotiterplatten Wascher wird empfohlen
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

5) REAGENZIEN UND PROBEVORBEREITUNG

Proben müssen bei -20°C gelagert werden (Langzeitlagerung bei -70°C). Bis zu vier Frier/Tau-Zyklen verändern die Messwerte nicht. Lipämische und Hämolytische Proben können falsche Ergebnisse liefern. Proben vor Verwendung gut mischen. Wir empfehlen Doppelbestimmungen.

Rekonstitution:

WASHBUF (Waschpuffer): Das mitgelieferte Konzentrat wird 1:20 verdünnt (zB. 50 ml WASHBUF + 950 ml destilliertes Wasser). Kristalle im Pufferkonzentrat lösen sich bei Raumtemperatur auf. Der verdünnte Puffer ist bei $2-8^{\circ}\text{C}$ bis zum Ablaufdatum haltbar. Im Testsystem darf nur verdünnter WASHBUF (Waschpuffer) verwendet werden.

Zellkultur Überstände:

Verdünnen Sie den OPG-STOCK (Osteoprotegerin Konzentrat) mit Zellkulturmedium 1:20 (1+19) für STD1 (50 μl OPG-STOCK + 950 μl Medium). Die weiteren Standards für die Standardkurve sind 1:2 (1+1) zu verdünnen:

STD1 (25 pmol/l)

250 μl STD1 + 250 μl Zellkulturmedium = STD2 (12,5 pmol/l)

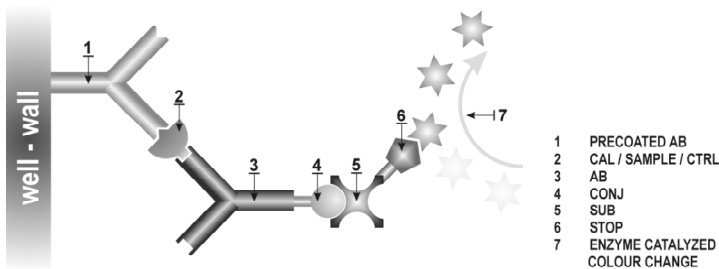
250 μl STD2 + 250 μl Zellkulturmedium = STD3 (6,25 pmol/l)

250 μl STD3 + 250 μl Zellkulturmedium = STD4 (3,13 pmol/l)

Verwenden Sie das Zellkulturmedium als STD0 (Standard 0)

Die Wahl des Standardbereiches hängt von der Menge des produzierten OPG der jeweiligen Zelllinie ab. Falls notwendig ist der Zellkulturüberstand mit Zellkulturmedium zu verdünnen.

6) TESTPRINZIP



7) TESTPROTOKOLL

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden welche Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen.
Markieren Sie die Positionen für BLANK/STD/PROBE/CTRL (Leerwert/Standard/Probe/Kontrolle) am Protokoll Blatt.
Nehmen Sie die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Alu Säckchen. Mindestens 1 Well für den Leerwert reservieren. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können mit Trockenmittel im Alu Säckchen bis zum angegebenen Ablaufdatum gelagert werden.

Pipettieren Sie 100 µl ASYBUF (Verdünnungspuffer) in alle Wells. Pipettieren Sie zusätzlich 100 µl in das Well für den Leerwert.
Pipettieren Sie 50 µl STD /PROBE/CTRL(Standard/Probe/Kontrolle) in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen, mit Ausnahme des Leerwertes, mischen.
Pipettieren Sie 50 µl AB (biotinylierter anti OPG Antikörper) in alle Wells, mit Ausnahme des Leerwertes, mischen.
Streifen abdecken und über Nacht (18-24 Stunden) +4°C inkubieren
Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit 300 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
Pipettieren Sie 200 µl CONJ (Konjugat) in alle Wells.
Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) inkubieren
Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit 300 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
Pipettieren Sie 200 µl SUB (Substrat) in alle Wells.
20 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren
Pipettieren Sie 50 µl STOP (Stoppösung) in alle Wells.
Extinktion unmittelbar bei 450 nm messen, mit 620 nm als Referenz, falls möglich.

8) BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Die OD des Leerwertes ist von allen Wells abzuziehen. Konstruieren Sie eine Standardkurve aus den Werten der Standards unter Verwendung von kommerziell erhältlichem halblogarithmischem Millimeterpapier oder einer geeigneten Software. Das Testsystem wurde evaluiert mit einer 4 Parameter Algorithmus. Andere Auswerte Algorithmen müssen vom Verwender evaluiert werden. Die Konzentration der Proben wird aus der Standardkurve abgelesen. Eventuell verwendete Verdünnungen müssen berücksichtigt werden.

9) TESTMERKMALE

Normawerte:	Median = 1,8 pmol/l (n = 1134; Alter 19-96) Jeder Verwender sollte den Normalbereich für seine Proben evaluieren
Standardbereich:	0 bis 30 pmol/l
Umrechnungsfaktor pg/ml zu pmol/l:	1 pg/ml = 0,05 pmol/l (MW: 19,9 kD)
Probenvolumen:	50 µl human EDTA Plasma, Heparin Plasma, Serum und Zellkulturüberstand
Detektionsgrenze:	(0 pmol/l + 3 SD): 0,14 pmol/l
Inkubationszeiten:	18 – 24 h / 1h / 20 min

10) PRÄZISION

Intra-Assay: 2 Proben wurden 16 mal in Doppelbestimmung in einem Test getestet.

Inter-Assay: 2 Proben wurden in Doppelbestimmung in 10 Tests getestet.

Intra-Assay (n=16)		
Durchschnitt (pmol/l)	4,59	10,76
SD	0,46	0,41
VK%	10%	4%

Inter-Assay (n=10)		
Durchschnitt (pmol/l)	5,53	10,1
SD	0,38	0,76
VK%	7%	8%

11) TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien von verschiedenen Lots oder Tests dürfen nicht gemischt werden.
- Stöpsel oder Verschlüsse von verschiedenen Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Abgelaufene Reagenzien dürfen nicht verwendet werden. Reagenzien sind vor direktem Sonnenlicht zu schützen.
- Substratlösung muss vor Verwendung farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen bei den Inkubationen mit Abdeckfolie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.

12) VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Bestandteile humanen Ursprunges wurden mit Tests der 3.Generation auf HIV Ak und HbsAG getestet und negativ gefunden. Trotzdem sollten die Reagenzien als potentiell infektiös behandelt werden.

Alle flüssigen Reagenzien enthalten 0.01% Thimerosal oder 0.01% Proclin 300 als Konservierungsmittel.

Thimerosal ist toxisch! Vermeiden Sie Kontakt mit Augen, Haut und Schleimhaut. Proclin 300 ist in der verwendeten Konzentration nicht toxisch. Allergische Reaktionen sind möglich.

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Nicht Rauchen, Essen, Trinken oder Kosmetika benutzen während der Verwendung der Testreagenzien
- Verwenden Sie Handschuhe zur Vermeidung jedes Kontaktes zu Reagenzien.
- Schwefelsäure reizt Augen und Haut. Bei Berührung gründlich mit Wasser spülen.

13) LITERATUR

- "Clinical Implications of the Osteoprotegerin/RANKL/RANK System for Bone and Vascular Diseases"
Lorenz C. Hofbauer, MD; Michael Schoppet, MD; JAMA, July 28, 2004—Vol 292, No. 4
- "Comparison of 10 serum bone turnover markers in prostate carcinoma patients with bone metastatic spread: diagnostic and prognostic implications".
Jung K; Lein M; Stephan C; Von Hosslin K; Semjonow A; Sinha P; Loening SA; Schnorr D Department of Urology, University Hospital Charite, Humboldt University of Berlin, Berlin, Germany. Int J Cancer 2004 Sep 20;111(5):783-91
- "Osteoprotegerin is a Risk Factor for Progressive Atherosclerosis and Cardiovascular Disease"
Stefan Kiechl, MD; Georg Schett, MD; Gregor Wenning, MD; Kurt Redlich, MD; Martin Oberhollenzer, MD; Agnes Mayr, MD; Peter Santer, MD; Josef Smolen, MD; Werner Poewe, MD; Johann Willeit, MD
Circulation. 2004;109:2175-2180.
- "Endurance running acutely raises plasma osteoprotegerin and lowers plasma receptor activator of nuclear factor kappa B ligand" [In Process Citation];
Ziegler S; Niessner A; Richter B; Wirth S; Billensteiner E; Woloszczuk W; Slany J; Geyer G
Metabolism 2005 Jul;54(7):935-8

1) INTRODUCTION

Ostéoprotégérin (OPG) ou "Osteoclast inhibitory factor" (OCIF) est une glycoprotéine dimère de la famille des récepteurs TNF avec une masse moléculaire de 60 kD resp. 120 kD . OPG agit comme un récepteur sécrété soluble pour RANKL qui intervient pour empêcher la liaison et l'activation de RANK (récepteur de l'activation et de la différenciation de l'ostéoclaste, ODAP) sur la surface de l'ostéoclaste, et donc inhibe le développement des ostéoclastes.

INDICATIONS POSSIBLES

- Ostéoporose post-ménopausique ou sénile
- Ostéoporose induite par glucocorticoïdes
- Maladies entraînant une activité de résorption locale accrue
- Suivi thérapeutique après traitement par OPG
- Arthrite
- Oncologie

2.) CONTENU DE LA TROUSSE

CONT	COMPOSANT DE LA TROUSSE	QUANTITE
PLATE	Plaque de barrettes de microtitrage revêtues d'anticorps monoclonal anti-OPG, avec portoir pour barrettes	12 x 8 tests
WASHBUF	Tampon de lavage, concentré 20x	1 x 50 ml
AB	Anticorps polyclonal biotinylé anti-OPG (bouchon jaune), prêt à l'emploi	1 x 7 ml
STD	Standards, (0; 0.37; 1.1; 3.3; 10; 30 pmol/l), prêts à l'emploi	6 x 500 µl
CTRL	Contrôle (bouchon jaune), prêt à l'emploi	1 x 500 µl
ASYBUF	Tampon de dosage, prêt à l'emploi	1 x 25 ml
CONJ	Conjugué, (streptavidin-HRPO), prêt à l'emploi	1 x 22 ml
SUB	Substrat (solution TMB), prêt à l'emploi	1 x 22 ml
STOP	Solution stop, prête à l'emploi	1 x 7 ml
OPG-STOCK	Ostéoprotégérin solution stock, bouchon rouge, (500 pmol/l)	1 x 500 µl

3) AUTRE MATERIEL INCLUS DANS LA TROUSSE

- 2 bandes de film adhésif
- QC protocole
- Une feuille de protocole
- Notice d'utilisation

4) MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Flacons de réaction 1,5 ml
- Micropipettes calibrées pour livrer 10-1000µl et embouts jetables
- Lecteur de microplaques ELISA pour lire l'absorbance à 450nm (ou de 450nm à 620nm)
- Un laveur de microplaques est conseillé pour l'étape de lavage
- Eau distillée ou déionisée

5) PREPARATION DES REACTIFS ET DES ECHANTILLONS

Les échantillons doivent être conservés à -20°C, ou à -70°C pour une conservation à long-terme, et peuvent subir jusqu'à 4 cycles de congélation / décongélation. Les échantillons lipémiques ou haémolysés peuvent fournir des résultats erronés. Les échantillons doivent être bien mélangés avant le dosage.

WASHBUF (Tampon de lavage) : Diluer le concentré 1:20: par exemple, 50 ml de WASHBUF + 950 ml d'eau distillée. Des cristaux dans le concentré de lavage dissoudront à température ambiante. Le tampon reste stable jusqu'à la date de péremption mentionnée sur l'étiquette.

Culture Cellulaire :

Diluer l'OPG-STOCK (Ostéoprotégérin solution stock) avec le milieu de culture cellulaire 1:20 pour STD1 (50µl d'OPG-STOCK + 950.µl de Milieu).

Diluer le Standard pour la courbe de Standards 1:2 comme démontré ci-dessous :

STD1 (25 pmol/l)

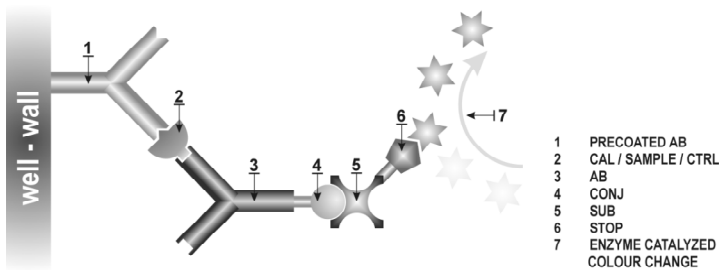
250 µl STD1 + 250 µl milieu de dilution = STD2 (12,5 pmol/l)

250 µl STD2 + 250 µl milieu de dilution = STD3 (6,25 pmol/l)

250 µl STD3 + 250 µl milieu de dilution = STD4 (3,13 pmol/l)

Utiliser le Milieu de culture cellulaire comme STD0 (Standard 0)

6) PRINCIPE DE L'ESSAI



7) PROTOCOLE DE L'ESSAI

Tous les réactifs et échantillons doivent être à température ambiante (18-26°C) avant l'utilisation.
Marquer la position du BLANK/STD/SAMPLE/CTRL (Blanc/Standard/Echantillon/Contrôle) sur le protocole.
Sortir du sac alu les barrettes de microtitrage et marquer-les correctement, marquant au minimum un puits comme Blanc. Conserver les barrettes non-utilisées, avec leur dessiccatif, à 2-8° C dans le sac alu. Les barrettes restent stables jusqu'à la date d'expiration marquée sur l'étiquette.

Rajouter 100µl de ASYBUF (Tampon de dosage) dans chaque puits. Rajouter 100µl additionnel dans blanc.
Rajouter 50µl de STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Echantillon/Contrôle) en double dans chaque puits, sauf le blanc
Rajouter 50µl de AB (anticorps polyclonal biotinylé anti-OPG) dans chaque puits, sauf le blanc, agiter doucement
Sceller la plaque et incuber pendant 18 à 24 heures à 4°C
Aspirer et laver 5 fois les puits avec 300µl de WASHBUF (Tampon de lavage) dilué. Eliminer tout WASHBUF restant en tapant la plaque contre une serviette en papier après le dernier lavage
Rajouter 200µl de CONJ (Conjugué) dans chaque puits
Sceller la plaque et incuber pendant une heure à 18-26°C
Aspirer et laver 5 fois les puits avec 300µl de WASHBUF (Tampon de lavage) dilué. Eliminer tout WASHBUF restant en tapant la plaque contre une serviette en papier après le dernier lavage
Rajouter 200µl de SUB (Substrat) dans chaque puits
Incuber pendant 20 min à 18-26°C dans le noir
Rajouter 50 µl de STOP (Solution stop) dans chaque puits
Mesurer immédiatement l'absorbance à 450nm avec une référence à 620 nm, si possible

8) CALCUL DES RESULTATS

Enlever l'extinction du Blanc des autres valeurs. Construire la courbe d'étalonnage à partir des valeurs standard, utilisant un logiciel prévu à cet effet ou simplement du papier graph. Obtenir la concentration des échantillons à partir de cette courbe. Le dosage a été évalué avec un algorithme 4PL. Les méthodes différentes pour caler les courbes doivent être évaluées par l'utilisateur. Les facteurs de dilution respectifs devraient être également pris en compte.

9) CARACTERISTIQUES DU DOSAGE

Gamme des valeurs normales:	Median = 1,8 pmol/l (n = 1134; age 19-96) Nous recommandons à chaque laboratoire d'établir sa propre gamme de valeurs normales.
Gamme standard:	0 à 30 pmol/l
Facteur de conversion pg/ml à pmol/l:	1 pg/ml = 0,05 pmol/l (MW: 19,9 kD)
Volume de l'échantillon:	50 µl plasma EDTA humain, plasma héparin, sérum, surnageant de culture cellulaire
Limite de détection:	(0 pmol/l + 3 SD): 0,14 pmol/l
Temps d'incubation :	18 – 24 h / 1h / 20 min

10) PRECISION

2 échantillons de concentrés connus ont été testé 16 fois à fin d'obtenir une précision intra-essai

2 échantillons de concentrés connus ont été testé pendant 10 essais pour obtenir une précision intra essai

Intra-Essai (n=16)		
Moyenne (pmol/l)	4,59	10,76
SD	0,46	0,41
CV%	10%	4%

Inter-Essai (n=10)		
Moyenne (pmol/l)	5,53	10,1
SD	0,38	0,76
CV%	7%	8%

11) CONSEILS TECHNIQUES

- Ne pas remplacer ou mélanger les réactifs qui sont fournis avec ce kit avec ceux de lots ou de sources différents.
- Ne pas mélanger les embouts ou bouchons de réactifs différents, ni utiliser les réactifs d'autres lots.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de leur date d'expiration. Protéger les réactifs contre le soleil.
- La solution substrat devrait rester incolore tant qu'elle n'est pas rajoutée à la plaque.
- Pour obtenir les résultats fiables, il est essentiel de sceller correctement la microplaque pendant les étapes d'incubation.
- Éviter de faire mousser les réactifs lors du mélange.

12) PRECAUTIONS

Les produits d'origine humaine utilisés dans ce test ont été testés avec les essais de troisième génération contre le VIH-Ab et l'AgHbs et ont été trouvés négatifs. Cependant, ils doivent être manipulés comme étant susceptibles de transmettre des maladies infectieuses.

Tous les réactifs en liquide contiennent 0,01% Thimerosal ou 0,01% Proclin 300 comme conservateur. Thimerosal est toxique ! Éviter tout contact avec la peau et la membrane muqueuse. Proclin 300 n'est pas toxique dans les concentrations utilisées dans cette trousse. Cependant, il peut entraîner les réactions allergiques et tout contact avec la peau ou les yeux doit être évité.

- Ne pas pipetter avec la bouche.
- Ne pas manger, boire, fumer, ni appliquer les produits cosmétiques pendant la manipulation des réactifs
- Porter les gants pour éviter tout contact avec les réactifs.
- L'acide sulfurique irrite les yeux et la peau. Laver avec de l'eau en cas de contact. Éviter le contact avec la peau et muqueuse. Les irritations sont possibles – laver avec de l'eau en cas de contact !!

13) LITERATURE

- "Clinical Implications of the Osteoprotegerin/RANKL/RANK System for Bone and Vascular Diseases"
Lorenz C. Hofbauer, MD; Michael Schoppet, MD; JAMA, July 28, 2004—Vol 292, No. 4
- "Comparison of 10 serum bone turnover markers in prostate carcinoma patients with bone metastatic spread: diagnostic and prognostic implications".
Jung K; Lein M; Stephan C; Von Hosslin K; Semjonow A; Sinha P; Loening SA; Schnorr D Department of Urology, University Hospital Charite, Humboldt University of Berlin, Berlin, Germany. Int J Cancer 2004 Sep 20;111(5):783-91
- "Osteoprotegerin is a Risk Factor for Progressive Atherosclerosis and Cardiovascular Disease"
Stefan Kiechl, MD; Georg Schett, MD; Gregor Wenning, MD; Kurt Redlich, MD; Martin Oberhollenzer, MD; Agnes Mayr, MD; Peter Santer, MD; Josef Smolen, MD; Werner Poewe, MD; Johann Willeit, MD
Circulation. 2004;109:2175-2180.
- "Endurance running acutely raises plasma osteoprotegerin and lowers plasma receptor activator of nuclear factor kappa B ligand" [In Process Citation];
Ziegler S; Niessner A; Richter B; Wirth S; Billensteiner E; Woloszczuk W; Slany J; Geyer G
Metabolism 2005 Jul;54(7):935-8

1) INTRODUZIONE

L'osteoprotegerina (OPG) or Osteoclast inhibitory factor (OCIF) è una proteina dimerica appartenente alla famiglia dei recettori del TNF; ha un peso molecolare di 60 kD o di 120 kD per il dimero. Agisce come recettore solubile del RANKL; la sua secrezione interferisce con il legame del RANKL al RANK (osteoclast differentiation and activation receptor, ODAR) presente sulla superficie degli osteoclasti e la sua attivazione, inibendo così lo sviluppo degli osteoclasti.

Il dosaggio dell'osteoprotegerina è indicato per lo studio di:

- Osteoporosi postmenopausale o senile.
- Osteoporosi indotta da glucocorticoidi.
- Malattie con aumento locale di riassorbimento osseo.
- Monitoraggio degli effetti della terapia con OPG.
- Artrite
- Tumori ossei o metastasi ossee.

2.) CONTENUTO DEL KIT

CONT	REATTIVI	QUANTITA
PLATE	Anticorpo monoclonale Anti-OPG legato alla superficie di pozzetti di una micropiasta.	12 x 8 determinazioni
WASHBUF	Tampone per il lavaggio, concentrato 20x	1 x 50 mL
AB	Anticorpo policlonale anti OPG biotinilato (tappo giallo), pronto per l'uso	1 x 7 mL
STD	Standard, (0; 0.37; 1.1; 3.3; 10; 30 pmol/L), pronto per l'uso	6 x 500 µL
CTRL	Controllo (tappo giallo), pronto per l'uso	1 x 500 µL
ASYBUF	Tampone, pronto per l'uso	1 x 25 mL
CONJ	Coniugate, (streptavidina- HRP), pronto per l'uso	1 x 22 mL
SUB	Substrato (TMB in soluzione), pronto per l'uso	1 x 22 mL
STOP	Soluzione di stop, pronta per l'uso	1 x 7 mL
OPG-STOCK	Soluzione madre di osteoprotegerina, tappo rosso, (500 pmol/L)	1 x 500 µL

3) MATERIALE AGGIUNTIVO CONTENUTO NEL KIT

- 2 copripiastra adesivi
- QC Protocollo
- Templato
- Manuale per l'uso

4) MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO

- Provette da 1,5 mL
- Micropipette a volume variabile con punte monouso da 10-1000µL
- Lettore di micropiastre con filtri da 450nm e 620nm.
- Lavatore di micropiastre
- Acqua distillata o deionizzata

5) PREPARAZIONE DEI REATTIVI E DEI CAMPIONI

Conservare i campioni a -20°C, o a -70°C per una migliore stabilità nel tempo. I campioni possono essere congelati-scongelati per un massimo di 4 volte. Non utilizzare campioni lipemici o emolizzati. Agitare su vortex i campioni prima dell'uso.

Modalità di ricostituzione dei reattivi:

WASHBUF (tampone per il lavaggio): Diluire il tampone concentrato 1:20: ad es. 50 mL WASHBUF + 950 mL di acqua distillata. I cristalli eventualmente presenti nella soluzione concentrata si dissolvono a temperatura ambiente. Il tampone per il lavaggio diluito è stabile a 2-8°C fino alla data riportata sull'etichetta del flacone.

Nel dosaggio usare esclusivamente WASHBUF (tampone per il lavaggio) diluito.

Culture cellulari:

Diluire il reattivo OPG-STOCK (Soluzione madre di osteoprotegerina) con il terreno di coltura 1:20 (1+19) per preparare lo STD1 (50µL OPG-STOCK + 950µL di terreno).

Preparare la curva standard nel modo seguente:

STD1 (25 pmol/L)

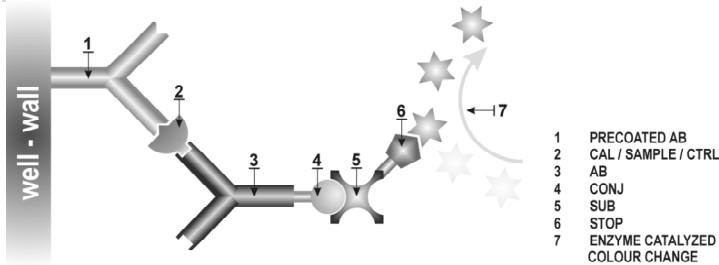
250 µL STD1 + 250 µL di terreno = STD2 (12.5 pmol/L)

250 µL STD2 + 250 µL di terreno = STD3 (6.25 pmol/L)

250 µL STD3 + 250 µL di terreno = STD4 (3.13 pmol/L)

Utilizzare il terreno di coltura come STD0 (Standard 0)

6) PRINCIPIO DEL METODO



7) PROTOCOLLO DEL DOSAGGIO

Portare tutti i reattivi a temperatura ambiente (18-26°C) prima dell'uso
Segnare sul template la posizione per BLANK/STD/SAMPLE/CTRL (Bianco/Standard/Campioni/Controllo)
Togliere le strip dalla busta, utilizzare almeno un pozzetto per il bianco. Conservare a 2-8°C le strip avanzate nella busta, chiusa accuratamente, con il dissecante. In queste condizioni le strip sono stabili fino alla data riportata sull'etichetta.

Aggiungere 100µL di ASYBUF (Tampone) in ciascun pozzetto. Aggiungere 100µL addizionale nel bianco.
Aggiungere 50µL di STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Campioni/Controlli) in duplicato nei rispettivi pozzetti, eccetti quelli per il bianco.
Aggiungere 50µL di AB (anticorpo anti OPG biotinilato) in tutti i pozzetti, eccetti quelli per il bianco, agitare delicatamente.
Coprire con il copripietra e incubare 18-24 ore a 4°C
Aspirare e lavare 5 volte i pozzetti con 300µL di WASHBUF diluito (tampone per il lavaggio), allontanare il tampone avanzato sul fondo dei pozzetti dopo l'ultimo lavaggio picchiettando la micropietra su un foglio di carta assorbente.
Aggiungere 200µL di CONJ (Coniugato) in ciascun pozzetto
Coprire con il copripietra e incubare 1 ora a temperatura ambiente (18-26°C)
Aspirare e lavare 5 volte i pozzetti con 300µL di WASHBUF diluito (tampone per il lavaggio), allontanare il tampone avanzato sul fondo dei pozzetti dopo l'ultimo lavaggio picchiettando la micropietra su un foglio di carta assorbente.
Aggiungere 200µL di SUB (Substrato) in ciascun pozzetto
Incubare 20 min a temperatura ambiente (18-26°C) al buio
Aggiungere 50µL di STOP (Soluzione di stop) in ciascun pozzetto
Misurare immediatamente l'assorbanza a 450nm contro 620 nm.

8) CALCOLO DEI RISULTATI

Sottrarre l'assorbanza del bianco da quella di standard, campioni e controllo. Costruire la curva standard ponendo in ordinata le assorbanze corrette degli standard e in ascissa le rispettive concentrazioni. E' possibile utilizzare un programma computerizzato per l'elaborazione dei dati. Utilizzare l'interpolazione a 4 parametri. Sistemi di interpolazione differenti devono essere convalidati dagli utilizzatori. Moltiplicare i risultati ottenuti per il rispettivo fattore di diluizione.

9) CARATTERISTICHE DEL DOSAGGIO

Valori normali:	Median = 1,8 pmol/l (n = 1134; age 19-96) Si raccomanda ad ogni laboratorio di stabilire i propri limiti di normalità.
Curva standard:	0 - 30 pmol/L
Fattore di conversione da pg/mL a pmol/L:	1 pg/mL = 0.05 pmol/L (MW: 19.9 kD)
Volume del campione:	50 µL di campione umano, plasma da EDTA o da eparina, siero, surnatante di coltura cellulare.
Sensibilità:	(0 pmol/L + 3 SD): 0.14 pmol/L
Tempo di incubazione:	18 - 24 h / 1h / 20 min

10) PRECISIONE

Intra-Saggio: 2 campioni a concentrazioni note di osteoprotegerina sono stati dosati 16 volte per valutare la precisione intra-saggio.

Inter-Saggio: 2 campioni a concentrazioni note di osteoprotegerina sono stati dosati in 10 esperimenti diversi per valutare la precisione inter-saggio.

Intra-Saggio (n=16)		
Media (pmol/L)	4,59	10,76
SD	0,46	0.41
CV%	10%	4%

Inter-Saggio (n=10)		
Media (pmol/L)	5,53	10,1
SD	0,38	0,76
CV%	7%	8%

11) CONSIDERAZIONI TECNICHE

- Non mescolare o sostituire i reattivi con altri da lotti o fonti diverse.
- Non scambiare i tappi di flaconi diversi e non usare reattivi da lotti differenti.
- Non usare i reattivi oltre la data di scadenza. Proteggere i reattivi dalla luce solare diretta.
- La soluzione del substrato deve rimanere incolore fino alla dispensazione nei pozzetti.
- Per avere risultati accurati è necessario chiudere ermeticamente le piastre con il copripiastre adesivo.
- Quando si agitano i reattivi evitare la formazione di schiuma.

12) PRECAUZIONI

Tutti i componenti di origine umana sono stati dosati con metodi di terza generazione per la determinazione di HIV-Ab e HBsAg; e sono stati trovati negativi. Si raccomanda di manipolare e di eliminare i reattivi come potenzialmente infettivi.

Tutti i reattivi liquidi contengono Thimerosal 0.01% o Proclin 300 0.01% come conservanti.

Il Thimerosal è tossico! Evitare il contatto con cute e mucose. Il Proclin 300 non è tossico alle concentrazioni usate in questo kit. Può usare reazioni cutanee allergiche - evitare contatti con cute o occhi.

- Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.
- Non mangiare, bere, fumare o utilizzare cosmetici quando si utilizzano reattivi per diagnostici.
- Quando si manipolano i reattivi utilizzare sempre guanti monouso.
- L'acido solforico è irritante per occhi e cute. In caso di contatti lavare con abbondante acqua corrente. Evitare il contatto con cute e mucose; il prodotto è irritante. In caso di contatti lavare con abbondante acqua corrente.

13) BIBLIOGRAFIA

- "Clinical Implications of the Osteoprotegerin/RANKL/RANK System for Bone and Vascular Diseases"
Lorenz C. Hofbauer, MD; Michael Schoppet, MD; JAMA, July 28, 2004—Vol 292, No. 4
- "Comparison of 10 serum bone turnover markers in prostate carcinoma patients with bone metastatic spread: diagnostic and prognostic implications".
Jung K; Lein M; Stephan C; Von Hosslin K; Semjonow A; Sinha P; Loening SA; Schnorr D Department of Urology, University Hospital Charite, Humboldt University of Berlin, Berlin, Germany. Int J Cancer 2004 Sep 20;111(5):783-91
- "Osteoprotegerin is a Risk Factor for Progressive Atherosclerosis and Cardiovascular Disease"
Stefan Kiechl, MD; Georg Schett, MD; Gregor Wenning, MD; Kurt Redlich, MD; Martin Oberhollenzer, MD; Agnes Mayr, MD; Peter Santer, MD; Josef Smolen, MD; Werner Poewe, MD; Johann Willeit, MD
Circulation. 2004;109:2175-2180.
- "Endurance running acutely raises plasma osteoprotegerin and lowers plasma receptor activator of nuclear factor kappa B ligand" [In Process Citation];
Ziegler S; Niessner A; Richter B; Wirth S; Billensteiner E; Woloszczuk W; Slany J; Geyer G
Metabolism 2005 Jul;54(7):935-8

1) INTRODUCCION

La Osteoprotegerina (OPG) ó Factor inhibidor de Osteoclastos (OCIF) es una glicoproteína dimérica de la familia del receptor del TNF con un peso molecular de 60 kD y 120 kD . La OPG actúa como un receptor soluble liberado para el RANKL que evita desde la unión hasta la activación del RANK (receptor para la diferenciación y la activación de los osteoclastos ODAR) en la superficie de los osteoclastos, evitando por tanto el desarrollo de los osteoclastos.

INDICACIONES POSIBLES

- Postmenopausia y Osteoporosis senil
- Osteoporosis inducida por Glucocorticoides
- Enfermedades con actividad de resorción local aumentada
- Monitorización de la terapia después del tratamiento con OPG
- Artritis
- Oncología

2.) CONTENIDO DEL KIT

CONT	COMPONENTES DEL KIT	CANTIDAD
PLACA	Tiras de micropocillos recubiertas de Anticuerpo Monoclonal anti-OPG incluidas en su soporte	12 x 8 tests
WASHBUF	Tampón de lavado, concentrado 20x	1 x 50 ml
AB	Anticuerpo policlonal biotinilado anti OPG (vial amarillo), listo para usar	1 x 7 ml
STD	Estándares, (0; 0.37; 1.1; 3.3; 10; 30 pmol/l), listos para usar	6 x 500 µl
CTRL	Control (vial amarillo), listo para usar	1 x 500 µl
ASYBUF	Tampón de ensayo, listo para usar	1 x 25 ml
CONJ	Conjugado, (estreptavidina- HRPO), listo para usar	1 x 22 ml
SUB	Substrato (solución de TMB , listo para usar	1 x 22 ml
STOP	Solución de parada , lista para usar	1 x 7 ml
OPG-STOCK	Solución stock de Osteoprotegerina, vial, rojo, (500 pmol/l)	1 x 500 µl

3) MATERIAL ADICIONAL INCLUIDO EN EL KIT

- 2 tiras adhesivas de plástico
- Hoja con el esquema de la placa
- Manual de instrucciones

4) MATERIAL Y EQUIPAMIENTO REQUERIDO PERO NO SUMINISTRADO

- Viales de reacción 1,5 ml
- Pipetas de precision calibradas de 10-1000 µl y puntas desechables
- Lector de Elisa con capacidad para leer absorbancias a 450 nm (ó desde 450 nm a 620 nm)
- Se recomienda utilizar lavador automático de placas
- Agua destilada o desionizada

5) PREPARACION DE LOS REACTIVOS Y DE LAS MUESTRAS

Las muestras deben almacenarse a -20°C , y para periodos prolongados, almacenar a -70°C . Todas las muestras pueden someterse únicamente a 4 ciclos de congelación-descongelación. Las muestras lipémicas o hemolizadas pueden conducir a resultados erróneos. Las muestras deben ser homogeneizadas antes de procesarse.

Reconstituir como se indica:

WASHBUF (Tampón de lavado): Diluir el concentrado 1:20: e.g. 50 ml WASHBUF + 950 ml agua destilada. Los cristales en el tampón de concentrado pueden disolverse a temperatura ambiente. El tampón es estable a $2-8^{\circ}\text{C}$ hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta.

Emplear solo WASHBUF diluido (Tampón de lavado) para la realización del ensayo:

Cultivos celulares:

Diluir la solución OPG-STOCK (solución stock de Osteoprotegerina) con el medio de cultivo celular 1:20 (1+19) para el STD1 (50 μl OPG-STOCK + 950 μl Medio).

Diluir el Standard para la curva standard 1:2 (1+1) como se muestra en el siguiente esquema:

STD1 (25 pmol/l)

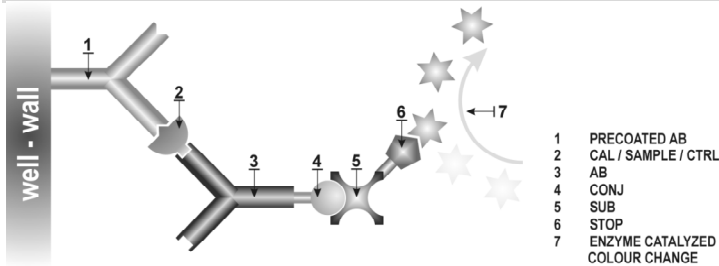
250 μl STD1 + 250 μl dilution medium = STD2 (12.5 pmol/l)

250 μl STD2 + 250 μl dilution medium = STD3 (6.25 pmol/l)

250 μl STD3 + 250 μl dilution medium = STD4 (3.13 pmol/l)

emplear el medio de cultivo celular como estándar cero STD0 (Standard 0)

6) PRINCIPIO DEL ENSAYO



7) PROTOCOLO DEL ENSAYO

Todos los reactivos y las muestras deben alcanzar la temperatura ambiente ($18-26^{\circ}\text{C}$) antes de su utilización en el ensayo.

Marcar la posición de BLAN/STD/MUES/CTRL (Blanco/Estándar/muestra/Control) en la hoja del esquema de la placa

Sacar las tiras de la bolsa de aluminio, emplear como mínimo un pocillo como blanco. Almacenar las tiras no utilizadas en la bolsa de aluminio con desecante a $2-8^{\circ}\text{C}$. Las tiras son estables hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta

Añadir 100 µl de ASYBUF (tampón de ensayo) en cada pocillo. Añadir 100 µl additionnel en cada blanco.
Añadir 50 µl de STD/MUESTRA/CTRL (Estándar/Muestra/Control) en duplicado en sus pocillos correspondientes, excepto el blanco
Añadir 50 µl de anticuerpo AB (biotinilado anti OPG) en cada pocillo , excepto el blanco, agitar suavemente con movimiento circular
Tapar con cuidado e incubar durante la noche (18-24h) a 4°C
Aspirar y lavar los pocillos 5x con 300 µl de WASHBUF diluido (Tampón de lavado), eliminar el WASHBUF remanente golpeando la placa suavemente sobre papel absorbente después del último lavado
Añadir 200 µl de CONJ (Conjugado) a cada pocillo
Tapar con cuidado e incubar a temperatura ambiente (18-26°C) durante 1 hora
Aspirar y lavar los pocillos 5x con 300 µl de WASHBUF diluido (tampón de lavado), eliminar el WASHBUF remanente golpeando la placa suavemente sobre papel absorbente después del último lavado
Añadir 200 µl de SUB (Substrato) en cada pocillo
Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente (18-26°C) en oscuridad
Añadir 50 µl de solución de parada (Stop solution) a cada pocillo
Medir la absorbancia inmediatamente a 450 nm y utilizar como referencia un filtro de 620 nm, si está disponible

8) CALCULO DE RESULTADOS

Restar el valor del blanco a todos los demás valores. Realizar una curva estándar a partir de los valores de los estándares. Utilizar un programa informático comercial o un papel de representación gráfica. Obtener el valor de la concentración de la muestra a partir de la curva estándar. El ensayo fue evaluado con un algoritmo de 4PL . Los métodos de ajuste de curvas empleados deben ser evaluados por el usuario. Se deben considerar los factores de dilución respectivos.

9) CARACTERISTICAS DEL ENSAYO

Rango Normal:	Mediana = 1.8 pmol/l (n = 1134; age 19-96) Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango de normalidad.
Rango estandard	0 a 30 pmol/l
Factor de Conversion de pg/ml a pmol/l:	1 pg/ml = 0.05 pmol/l (MW: 19.9 kD)
Volumen de muestra:	50 µl plasma EDTA humano, plasma heparinizado, suero, sobrenadante de cultivo celular
Limite de Detección	(0 pmol/l + 3 SD): 0.14 pmol/l
Tiempo de Incubación:	18 – 24 h / 1h / 20 min

10) PRECISION

Intra-Ensayo: Para valorar la precisión intra-ensayo se analizaron 16 replicados de 2 muestras de concentraciones conocidas

Inter-Ensayo: Para valorar la precisión inter-ensayo se analizaron 2 muestras de concentraciones conocidas en 10 ensayos

Intra-Ensayo(n=16)		
Media (pmol/l)	4.59	10.76
SD	0.46	0.41
CV%	10%	4%

Inter-Ensayo (n=10)		
Media (pmol/l)	5.53	10.1
SD	0.38	0.76
CV%	7%	8%

11) OBSERVACIONES TECNICAS

- No mezclar o sustituir reactivos de diferentes lotes o fabricantes.
- No mezclar los tapones de los viales de diferentes reactivos o de reactivos de diferentes lotes.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad. Proteger los reactivos de la acción directa de la luz solar.
- La solución de sustrato debería permanecer incolora hasta que se añada a la placa.
- Para asegurar unos resultados más exactos, tapar la placa con el papel adhesivo durante los pasos de incubación.
- Evitar la formación de espuma al mezclar los reactivos.

12) PRECAUCIONES

Todos los componentes de procedencia humana fueron testados con ensayos de 3ª generación frente a la presencia de anticuerpos HIV y al antígeno de superficie de la Hepatitis B; con resultado negativo. Sin embargo, deberían manipularse y eliminarse como si se tratara de material potencialmente infeccioso.

Todos los reactivos líquidos contienen Timerosal al 0.01% o Proclina 300 al 0.01% como conservante.

¡El Timerosal es tóxico! Evitar el contacto con la piel ó con las membranas mucosas. La Proclina 300 no es tóxica en las concentraciones empleadas en este kit. Puede provocar reacciones alérgicas en la piel, evitar el contacto con la piel ó los ojos.

- No pipetear con la boca.
- No comer o beber o aplicarse cosméticos en las zonas de manipulación de los reactivos.
- Evitar el contacto con los reactivos utilizando guantes.

El ácido sulfúrico es irritante para los ojos y la piel. Enjuagar con abundante agua si se produce contacto. Evitar el contacto con la piel y con las membranas mucosas . Puede presentarse irritación. Si tiene lugar un contacto, enjuagar con abundante agua.

13) LITERATURA

- "Clinical Implications of the Osteoprotegerin/RANKL/RANK System for Bone and Vascular Diseases"
Lorenz C. Hofbauer, MD; Michael Schoppet, MD; JAMA, July 28, 2004—Vol 292, No. 4
- "Comparison of 10 serum bone turnover markers in prostate carcinoma patients with bone metastatic spread: diagnostic and prognostic implications".
Jung K; Lein M; Stephan C; Von Hosslin K; Semjonow A; Sinha P; Loening SA; Schnorr D Department of Urology, University Hospital Charite, Humboldt University of Berlin, Berlin, Germany. Int J Cancer 2004 Sep 20;111(5):783-91
- "Osteoprotegerin is a Risk Factor for Progressive Atherosclerosis and Cardiovascular Disease"
Stefan Kiechl, MD; Georg Schett, MD; Gregor Wenning, MD; Kurt Redlich, MD; Martin Oberhollenzer, MD; Agnes Mayr, MD; Peter Santer, MD; Josef Smolen, MD; Werner Poewe, MD; Johann Willeit, MD
Circulation. 2004;109:2175-2180.
- "Endurance running acutely raises plasma osteoprotegerin and lowers plasma receptor activator of nuclear factor kappa B ligand" [In Process Citation];
Ziegler S; Niessner A; Richter B; Wirth S; Billensteiner E; Woloszczuk W; Slany J; Geyer G
Metabolism 2005 Jul;54(7):935-8

SYMBOLS



Expiry date / Verfallsdatum / Date de péremption / Data di scadenza / Fecha de caducidad / Data de validade / Uiterste gebruiksdatum / Udløbsdato / Utgångsdatum / Termin Ważności / Lejárati idő / Doba expirácie / Doba expire



Consider instructions for use / Bitte Gebrauchsanweisung beachten / Consultez la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las instrucciones de utilización / Consulte as instruções de utilização / Raadpleeg de gebruiksaanwijzing / Se brugsanvisningen / Läs anvisningarna före användning / Proszę przeczytać instrukcję wykonania / Vegyűk figyelembe a használati utasításban foglaltakat / Postupujte podľa pokynov na použitie / Postupujte dle návodu k použití



In vitro Diagnostic Medical Device (for in Vitro Diagnostic Use)/ In vitro Diagnostikum (zur In-vitro-Diagnostik) / Dispositif médical de diagnostic in vitro (Pour usage diagnostique in vitro) / Dispositivo medico per diagnostica in vitro (per uso diagnostico in vitro) / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro (para uso diagnóstico in vitro) / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro (Para utilização de diagnóstico "in vitro") / Medisch hulpmiddel voor diagnostiek in vitro (Voor diagnostisch gebruik in vitro) / Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik (Udelukkende til in vitro diagnostisk anvendelse) / Medicinteknisk produkt avsedd för in vitro-diagnostik (För in vitro-diagnostiskt bruk) / Wyrób medyczny do Diagnostyki In Vitro / In vitro orvosdiagnosztikai termék / In vitro diagnostický zdravotnický materiál (určené pro diagnostiku „in vitro“) / In vitro diagnostický zdravotnický materiál (určeno pro diagnostiku „in vitro“)



Lot-Batch Number / Charge-Chargennummer / Lot-Code du lot / Lotto-Numero di lotto / Lote-Código de lote / Lote-Código do lote / Lot-Partijnummer / Lot-Batchkode / Lot-Satskod / Numer serii / Lot-Batch szám / Číslo šarže / Číslo šarže



Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por / Vervaardigd door / Fabrikation af / Tillverkad av / Wyprodukowane pr / Gyártotta / Vyrobené / Vyrobeno



Catalogue Number / Bestellnummer / Numéro de référence / Numero di riferimento / Número de referencia / Número de referência / Referentienummer / Referencenummer / Katalognummer / Numer katalogowy / Katalógusszám / Katalógové číslo / Katalogové číslo



Store at between / Lagerung bei zwischen / Conserver à entre / Conservare a tra / Conservar a temp. entre / Armazene a entre / Bewaar bij tussen / Opbevares mellem / Förvaras vid / Przechowywać w / Tároljuk között / Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí



Contains sufficient for x tests / Inhalt ausreichend für x Tests / Contient suffisant pour x tests / Contenido suficiente per x test / Contiene suficiente para x pruebas / Contém suficiente para x testes / Bevat voldoende voor x bepalingen / Indeholder tilstrækkeligt til x prøver / Innehållet räcker till x analyser / Zawartość na x testów / Tartalma X teszt elvégzésére elegendő / Obsahuje materiál pre x testov / Obsahuje materiál pro x testů

BI-20402 OSTEOPROTEGERIN

ASSAY PROTOCOL AND CHECKLIST

- Bring all reagents to room temperature (18 – 26°C)
- Prepare reagents and samples as instructed
- Bring unused and prepared components to the storage temperature mentioned in the package insert
- Take microtiter strips out of the alu bag and mark positions on the protocol sheet
- Add 100 µl ASYBUF (Assay buffer) into each well. Pipette additional 100 µl into well marked as blank.
- Add 50 µl STD/SAMPLE/CTRL (standard/sample/control) into all wells except blank,
- Add 50 µl AB (biotinylated anti OPG ab) into each well, except blank, swirl gently
- Cover tightly and incubate at 4°C over night (18-24 hours)**
- Aspirate and wash wells with 300 µl WASHBUF (Wash buffer) five times. Remove remaining buffer by hitting plate against paper towel.
- Add 200 µl CONJ (Conjugate) into each well
- Cover tightly and incubate at room temperature (18-26°C) for 1 hour**
- Aspirate and wash wells with 300 µl WASHBUF (Wash buffer) five times. Remove remaining buffer by hitting plate against paper towel.
- Add 200 µl SUB (Substrate) into each well
- Incubate at room temperature (18-26°C) for 20 minutes, in the dark**
- Add 50 µl STOP (Stop solution) into each well
- Read Optical Density at 450 nm with reference 620 nm, if available